

Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН

PONTUS EUXINUS  
ПОНТ ЭВКСИНСКИЙ : XI



## ПОНТ ЭВКСИНСКИЙ – 2019

XI Всероссийская научно-практическая конференция для молодых  
учёных по проблемам водных экосистем,

посвященная памяти д.б.н., проф. С. Б. Гулина

*Материалы конференции*

Севастополь, 23–27 сентября 2019 г.

Севастополь  
ФИЦ ИнБЮМ

2019

Таким образом, согласно микробиологическим показателям, а, также учитывая химический анализ донных осадков, по уровню загрязнения можно расположить исследуемые акватории в такой последовательности. Наиболее загрязнённой является б. Александровская, промежуточное положение занимает б. Казачья, а наиболее чистой остаётся б. Ласпи.

Работа выполнена по теме государственного задания ФИЦ ИнБЮМ № АААА-А18-118020890090-2 («Молисмологические и биогеохимические основы гомеостаза морских экосистем»), при поддержке РФФИ и г. Севастополя в рамках научного проекта № 18-34-50005 («Наставник»).

#### Список литературы

1. Санитарно-биологические исследования прибрежных акваторий юго-западного Крыма в начале XXI века / Под ред.: О.Г. Миронова, С.В. Алёмова; Институт морских биологических исследований имени А.О.Ковалевского РАН.- Симферополь: ИТ "АРИАЛ", 2018. 276 с.
2. Соловьёва О.В., Тихонова Е.А., Клименко Т.Л., Скрыпник Г.В., Вотинова Т.В. Органические вещества донных отложений в условиях урбанизации побережья (на примере бухты Казачьей, Черное море) // Океанология. 2019. Т. 59. № 2. С. 234–242.
3. Тихонова Е.А., Котельянец Е.А., Соловьёва О.В. Оценка уровня загрязнения донных отложений крымского побережья Черного и Азовского морей // Принципы экологии. 2016. № 5 (21). С. 56–70.

### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОРСКОЙ ДИАТОМОВОЙ ВОДОРОСЛИ *PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM* ДЛЯ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА ВОДНОЙ СРЕДЫ

Ипатова В.И.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

*Ключевые слова: Phaeodactylum tricornutum, биотестирование, качество воды*

Для биотестирования морской среды, водных вытяжек из солевых отходов или других соленых проб, токсичности загрязняющих морскую среду веществ и соединений используют альгологически чистую культуру морской диатомовой водоросли *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. Вид представлен клетками овально-треугольной формы с шипиками на концах. Клетки неподвижны, длина 13-16 мкм. Размножение вегетативное, путем простого деления клеток надвое. Численность клеток увеличивается за трое суток не менее чем в 3 раза. После пересева культуры на новую среду, экспоненциальная фаза роста наступает на 4 сутки. Данный вид используется в международном стандарте оценки качества воды (ИСО 10253: 2006 Качество воды. Тест по угнетению роста морских водорослей *Skeletonema costatum* и *Phaeodactylum tricornutum*). Диапазон солености для обеспечения жизнедеятельности морских водорослей *Phaeodactylum tricornutum* в природных условиях составляет от 25 до 35 ‰.

Водоросли для биотестирования выращивают на среде Гольдберга в модификации Кабановой. Питательную среду готовят на искусственной морской воде с добавлением морской соли. Дважды стерилизуют, нагревая до температуры 75-80°C и охлаждают до комнатной температуры. В подготовленную таким образом морскую воду добавляют необходимое количество каждой питательной соли из их концентрированных растворов ( $\text{KNO}_3$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O} + \text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ). Затем среду стерилизуют третий раз,

охлаждают и добавляют раствор железа ( $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ). Приготовленная таким образом среда используется для культивирования водорослей в качестве контрольной среды и с добавками тестируемых веществ в опытах. Водоросли культивируют в колбах в люминистате при температуре  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , освещенности 4,5 клк и периодически перемешивают, встряхивая 2 раза в сутки. Соблюдается световой суточный ритм.

Токсичность веществ для водорослей можно оценивать по целому ряду показателей — побурение, посветление, лизис клеток, изменение рН среды в культуре; определение соотношения живых и мертвых клеток методом люминесцентной микроскопии. Для более полной оценки токсического действия веществ дополнительно можно использовать такие показатели как определение биомассы водорослей (расчетным способом по объему клеток); определение содержания фотосинтетических пигментов — хлорофиллов, каротиноидов (с помощью экстрагирования ацетоном); определение интенсивности фотосинтеза; скорость деления клеток водорослей и многие другие.

Для целей практического экологического контроля аттестованными методиками предписывается определение изменения прироста численности клеточной популяции водорослей или флуоресцентных показателей в опыте относительно контроля. Для опытов используют водоросли в экспоненциальной фазе роста, что соответствует трехсуточной культуре после пересева. Начальная плотность клеток должна быть не менее 10 тыс. кл/мл и не более 50 тыс. кл/мл. Исходная численность меньше 10 тыс. кл/мл дает большую ошибку при подсчете клеток в камере Горяева. Нами экспериментально установлено, что с увеличением начальной плотности популяции более 50 тыс. кл/мл токсичность веществ уменьшается, поскольку количество токсиканта, приходящееся на 1 клетку (доза токсиканта) становится меньше, что искажает результаты биотестирования.

Опыты проводят в трех повторностях для каждой пробы и контроля. Подсчет численности клеток в острых опытах проводят на 1, 2 и 3 сутки. Общее число клеток подсчитывают в камере Горяева или Нажотта. Стандартный объем данных камер 0,0001 мл (камера Горяева) и 0,1 или 0,3 мл (камера Нажотта). Каждую повторность просчитывают не менее чем в двух сетках камеры Горяева. При невысокой исходной плотности культур (5-10 тыс. кл/мл) для просчета численности целесообразно использовать счетные камеры большего объема (камеры Нажотта). Достоверность различия численности клеток в контроле и опыте устанавливают, используя критерий Стьюдента, Манна-Уитни или Даннета.

Помимо методов прямого подсчета клеток водорослей в счетных камерах возможно измерение фотосинтетической активности клеток с использованием отечественных и импортных приборов (флуориметров или различных РАМ). Данный метод основан на том, что при внесении загрязняющих веществ происходит резкое изменение флуоресценции хлорофилла в клетках. Регистрируемая величина - квантовый выход флуоресценции является количественной мерой токсичности пробы по отношению к контролю. На основе данного метода в РФ разработана и аттестована для целей государственного экологического контроля экспресс-методика биотестирования токсичности вод и отходов с использованием флуориметра Фотон-10 (ПНД Ф 14.1:2.4.16-09 16.1:2.3.3.14-09). Длительность анализа с учетом одночасовой экспозиции клеток водоросли в тестируемой пробе не превышает 1,5 часов. В Европе и США используется методика исследования токсичности проб с использованием приборов серии РАМ согласно требованиям OECD. Исследуется фотосинтетическая активность тест-культуры после 4 часовой экспозиции. Для характеристики функционального состояния фотосинтетического аппарата водорослей часто используют метод регистрации замедленной люминесценции (флуоресценции) хлорофилла. Метод замедленной люминесценции позволяет также судить о повышении или, наоборот, снижении устойчивости клеток водорослей к токсическому воздействию.

Поскольку соленость водных вытяжек из промышленных отходов и глинисто-солевых шламов, образующихся при производстве калийных удобрений, может выходить за пределы солености (25-35‰), обеспечивающие нормальную жизнедеятельность водорослей, проводится предварительная адаптация маточной культуры водорослей с постепенным изменением солености культивационной воды. Для адаптации культуры к разным уровням солености может потребоваться до трех последовательных пересевов культуры в среды с повышенным или пониженным уровнями солености маточной культуры. Пробы из галитовых отходов и глинисто-солевых шламов могут быть неоднородными и иметь разную соленость, что может приводить к разным результатам биотестирования сходной пробы в разных опытах. А присутствие в пробах с разной соленостью еще и тяжелых металлов с увеличением срока экспозиции (в хронических испытаниях) может приводить к накопительному эффекту металлов и усилению токсического эффекта со временем.

В результате биотестирования определяют эффективную концентрацию ( $ЭК_{50}$ ), вызывающую 50% снижение численности или эффективности фотосинтеза, за 3-4 суток пробит-анализом или графическим способом. Длительность острого опыта 3-4 суток, а хронического - 14-21 суток. Только в длительном эксперименте можно обнаружить токсичность малых концентраций вследствие накопительного эффекта токсиканта и выявить отдаленные последствия интоксикации, не обнаруженные в краткосрочных опытах.

Государственное задание МГУ имени М.В. Ломоносова часть 2 (тема № АААА-А16-116021660047-6).

## ГЕНОТОКСИЧНОСТЬ ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ АЗОВСКОГО МОРЯ

Карчава Ш.К., Климова М.В., Барабашин Т.О., Кудеевская Е.М., Ажогина Т.Н., Аль-Раммахи А.А.К.

Южный федеральный университет, Азово-Черноморский филиал «ВНИРО»  
(«АзНИИРХ») г. Ростов-на-Дону, Россия

*Ключевые слова: цельноклеточные lux-биосенсоры, генотоксичность*

За последние десятилетия отмечено усиление антропогенной нагрузки на объекты окружающей среды, что выразилось ее значительным загрязнением токсичными соединениями [2]. В результате разных видов хозяйственной деятельности ежегодно большое количество поллютантов попадают в окружающую среду. Это всевозможные сельскохозяйственные ядохимикаты, такие как гербициды и т.п. Данные веществ ядовиты для большинства организмов, их отличает высокая персистентность и способность к аккумуляции [3]. В связи с этим большее значение приобретает проблема контроля качества природных объектов.

Целью работы была оценка генотоксичности донных отложений Азовского моря. Материалом служили 32 образца, отобранных в различных местах Азовского моря.

Для тестирования генотоксичности образцов донных отложений использовали цельноклеточные бактериальные сенсоры на основе люминесцентных бактерий. В настоящее время цельноклеточные lux-биосенсоры являются ценным инструментом, позволяющим осуществлять эффективный контроль за качеством и безопасностью окружающей среды [1]. Для контроля генотоксичности использовался биосенсор *E. coli* MG1655 (pRecA-lux). Мерой токсичности служил фактор индукции (I), рассчитываемый как отношение биолюминесценции опытной пробы к биолюминесценции контрольной пробы. При достоверном отличии опыта от контроля  $1 < 2$ , обнаруженный токсический